

INOCULANTES PARA ALFALFA. INFLUENCIA DEL pH EN EL CRECIMIENTO Y SUPERVIVENCIA DE CEPAS DE *Rhizobium meliloti*

L. M. Mazza (1), L. M. Avellá (2), M. D. Pastor (3) y A. P. Balatti (4)

Recibido: 24/4/85

Aceptado: 30/8/85

RESUMEN

En el presente trabajo se estudió la influencia del pH sobre el crecimiento de 2 cepas de *Rhizobium meliloti* es un medio líquido que permite alcanzar altas concentraciones celulares en tiempos cortos de proceso. Además se consideró la supervivencia de las mismas cepas en soportes sobre la base de turba a diferentes pH iniciales. Por último se estudió el comportamiento de los inoculantes obtenidos en experimentos realizadas en campo. Se alcanzaron concentraciones celulares del orden de 10^{10} células/mililitro en 26 horas de proceso, utilizando un medio balanceado y pH inicial 6.5-7.0. El mayor crecimiento y supervivencia en la turba fueron obtenidos en los inoculantes con pH inicial 6,5 y 7,0 y en los cuales, a los 180 días, la viabilidad fue del orden de 10^{10} células/gramo. En las experiencias en campo la mayor nodulación y peso seco de la parte aérea de las plantas fueron obtenidas con los inoculantes de pH 6,5 y 7,0. Los ensayos de crecimiento en medio líquido y supervivencia en turba muestran buena correlación e indican que las cepas ensayadas son sensibles a valores inferiores a pH 6,5.

ALFALFA INOCULANTS. EFFECT OF pH ON THE GROWTH AND SURVIVAL OF *Rhizobium meliloti* STRAINS

SUMMARY

The objective of this study was to determine the pH influence on the growth of *Rhizobium meliloti* in liquid medium and the survival on a peat base inoculants of strains used in inoculants production, whose performance was tested later on field trials. In a balanced medium with an initial pH 6.5-7.0 a cellular concentration of 10^{10} cell/ml in 26 hours process was obtained. The number of viable cells after 6 month storage on irradiated peat was about 10^{10} cell/g for pH values of 6.5 and 7.0. In field trials the best nodulation and dry weight were observed with inoculants of 6.5 and 7.0 values. Growth experiences in liquid medium and viability on irradiated peat indicated that the studied *Rhizobium meliloti* strains are sensible to pH values lower than 6.5.

1) y 4) Miembros Carrera del CONICET.

2) y 3) Becarios del CONICET.

INTRODUCCION

Entre las características que deben presentar las cepas de *Rhizobium* destinadas a la inoculación de leguminosas se destacan entre otras: buen comportamiento en todas las etapas de obtención del inoculante y fundamentalmente alta capacidad de nodulación y fijación de nitrógeno frente a la planta huésped para diferentes condiciones de suelo y clima. La dificultad de disponer de cepas que cumplan con todos estos requisitos lleva a la necesidad de seleccionar las que mejor se adapten a las exigencias requeridas. Entre los numerosos factores que afectan el comportamiento del *Rhizobium*, el pH del suelo es uno de los más conocidos y ha conducido a proponer distintas soluciones a fin de superar las limitaciones en la nodulación y fijación de nitrógeno debidas a dicho parámetro. El uso de cepas tolerantes a bajos valores de pH es una de las propuestas para resolver el problema de la acidez de los suelos donde se cultiva alfalfa. La capacidad del *Rhizobium* para tolerar bajos valores de pH en medios líquidos tiene, según Keyser *et al.* (1979), valor predictivo en la preselección de cepas que forman nódulos efectivos frente a su leguminosa en suelos ácidos. La tolerancia a la acidez ha sido estudiada por Date y Halliday (1979) en experiencias de crecimiento en medio líquido utilizando fuentes de carbono que permiten mantener el pH inicial durante el desarrollo celular. Por otra parte Keyser y Munns (1979) siguen el crecimiento en medios con manitol empleando muy bajas concentraciones iniciales de células y encuentran que hasta valores de 10^7 células/mililitros no se producen variaciones del pH. Si bien ambas técnicas son recomendadas por su simplicidad, el tiempo requerido para evaluar el crecimiento insume no menos de 10 días. Teniendo en cuenta que parte de los suelos donde se siembra alfalfa son de naturaleza ácida y en razón de que *Rhizobium meliloti* es una de las especies de crecimiento rápido menos tolerante a la aci-

dez (Vincent, 1977), resulta importante establecer la sensibilidad al pH de las cepas que se utilizan en la inoculación de alfalfa. En el presente trabajo se estudió la influencia del pH sobre el crecimiento de dos cepas de *Rhizobium meliloti* en un medio líquido de producción que permite alcanzar altas concentraciones en tiempos cortos de proceso. Por otra parte se considera la supervivencia de las cepas ensayadas en soportes sobre la base de turba a diferentes pH. Por último se estudió el comportamiento de los inoculantes obtenidos en experiencias realizadas en campo.

MATERIALES Y METODOS

Cepas

Se utilizaron dos cepas de *Rhizobium meliloti* identificadas con las siglas B 310 y B 323 suministradas por INTA Castelar.

Medios

Los estudios de crecimiento fueron efectuados en un medio industrial de producción de la siguiente composición: (g/l) Sacarosa 10,00; PO_4HK_2 0,50; SO_4Mg $7\text{H}_2\text{O}$ 0,20; ClNa 0,10; NO_3K 0,80; agua de levadura 100 ml; solución al 10% SO_4Mn 0,10 ml y solución al 10% de Cl_3Fe 0,10 ml (Balatti y Mazza, 1978). El medio inóculo fue de composición similar salvo que se utilizó 5 g/l de sacarosa y el agua de levadura se reemplazó por extracto de levadura Oxoid en la concentración de 1 g/litro.

Inóculo

Los inóculos fueron preparados a partir de un desarrollo en medio sólido (medio inóculo adicionado de 15 gramos/litro de agar) y transferido a las 24 horas de proceso. En todos los casos la concentración inicial de inóculo se ajustó a 10^8 células/mililitro.

Crecimiento celular

La evolución del crecimiento se realizó mediante determinaciones de densidad óptica en un espectrofotómetro Spectronic 20 a 600 nm y por recuento del número de células viables.

Obtención de las suspensiones de *Rhizobium*

El pH de los medios fue ajustado a los valores de 5,75; 6,00; 6,50; 7,00 y 7,50 empleando HCl ó NaOH 1 normal después de su esterilización a 121°C durante 15 minutos. Los inóculos fueron desarrollados en erlenmeyers de 250 ml con 50 ml de medio, mientras que los procesos fermentativos fueron realizados en erlenmeyers de 1.000 ml con 200 ml de medio. Estos experimentos se hicieron en agitador rotatorio a 250 r.p.m. y 2,5 cm de excentricidad en cuarto estufa a 28° centígrados.

Preparación de inoculantes

Como material soporte se empleó turba de Tierra del Fuego secada al 10 por ciento de humedad, molida y tamizada por malla Nº 200. Se prepararon soportes con diferentes valores de pH (6,00; 6,30; 6,50 y 7,00) por neutralización con CaCO_3 . Este material fue colocado en bolsas de polietileno y tratado con radiaciones gamma (5 Mrd) en la Comisión Nacional de Energía Atómica. La impregnación se realizó inyectando en cada bolsa y en forma aséptica la cantidad de un mismo cultivo obtenido en pH 6,5 para lograr una humedad final del 55 por ciento. Los inoculantes fueron mantenidos a la temperatura de 20°C.

Diseño de experimentos en campo

Se efectuaron en un suelo de pH 6,1-6,2 en la región centro-oeste de la Prov. de Bue-

nos Aires. Se empleó un diseño de bloques al azar con 4 repeticiones en parcelas de 12 líneas de 6,0 m de largo, distanciadas 0,2 m entre sí. Las unidades experimentales estaban separadas por caminos de 1 metro, trazándose en el medio y a lo largo de aquellos, zanjas de 0,3 m de ancho e igual profundidad. La siembra se realizó a razón de 10 kg por ha utilizando semilla de alfalfa ecotipo pampeano. La inoculación se efectuó mezclando la semilla y los distintos inoculantes, a los 150 días de su preparación, antes de procederse a la siembra. Se adicionó la dosis de inoculantes en la relación de 250 gramos para 25 kg de semilla. A los 60 días de la germinación se procedió al recuento de nódulos y se determinó la materia seca de la parte aérea de las plantas. Con los datos obtenidos se realizó el análisis de la variancia y se aplicó la prueba de Duncan con el nivel de 5 por ciento de probabilidad. Se utilizó un programa de regresión lineal.

RESULTADOS

En las Figuras 1 y 2 se presentan los resultados de las experiencias de crecimiento en medio líquido para ambas cepas desarrolladas a distintos valores iniciales de pH. Se observa que a pH 5,75 prácticamente no se obtuvo crecimiento. A los valores de pH 6,0 el crecimiento resultó limitado mientras que los mayores valores de densidad óptica se alcanzaron a pH 6,5 y 7,0 siendo el número de viables a las 26 horas de proceso y para ambas cepas del orden de 10^{10} células/mililitro. Las curvas de evolución de pH muestran para los medios con valores iniciales de 6,5; 7,0 y 7,5 un comportamiento similar con un ligero descenso durante la etapa de máxima velocidad de crecimiento y posterior incremento en las últimas horas del proceso. Las experiencias realizadas a pH más bajos (5,75 y 6,0) muestran una evolución diferente con tendencia a una continua disminución.

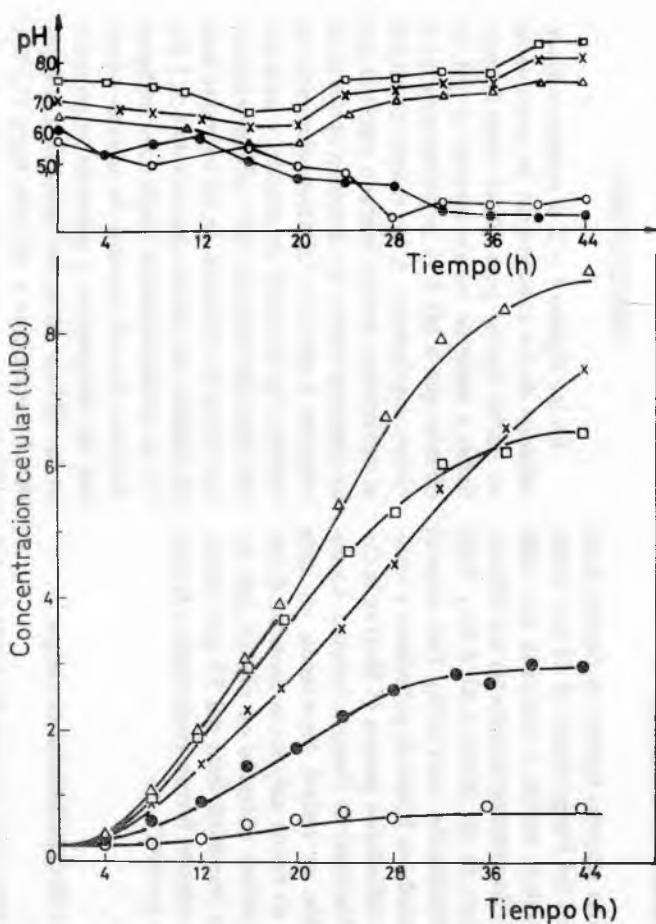


Figura 1: Crecimiento de *Rhizobium meliloti* (cepa B 323) en medio líquido. Influencia del pH.
 pH inicial: ○ 5,75 ; ● 6,00; Δ 6,50; X 7,00 y □ 7,50.

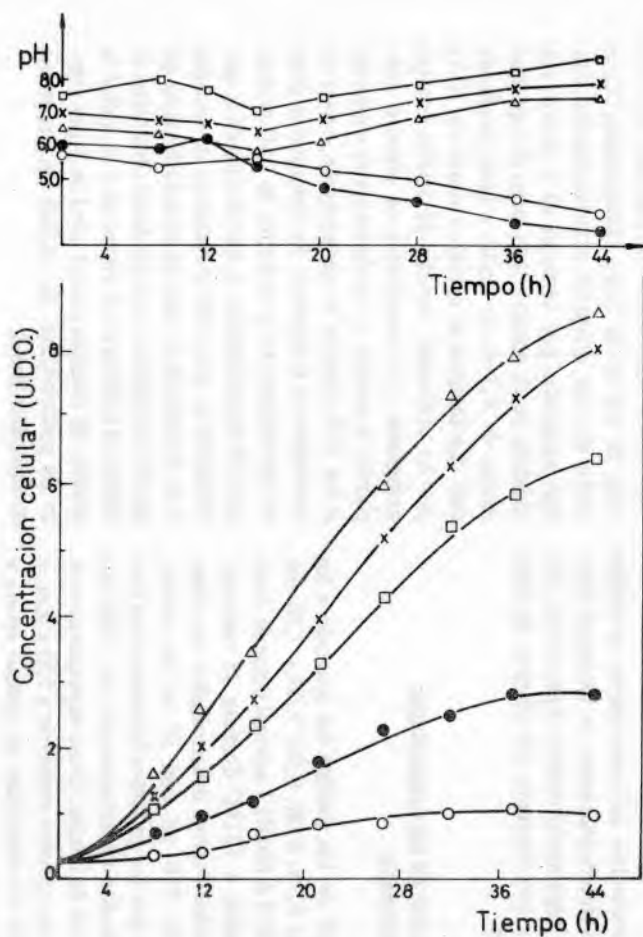


Figura 2: Crecimiento de *Rhizobium meliloti* (cepa B 310) en medio líquido. Influencia del pH.
pH inicial: ○ 5,75; ● 6,00; Δ 6,50; X 7,00 y □ 7,50.

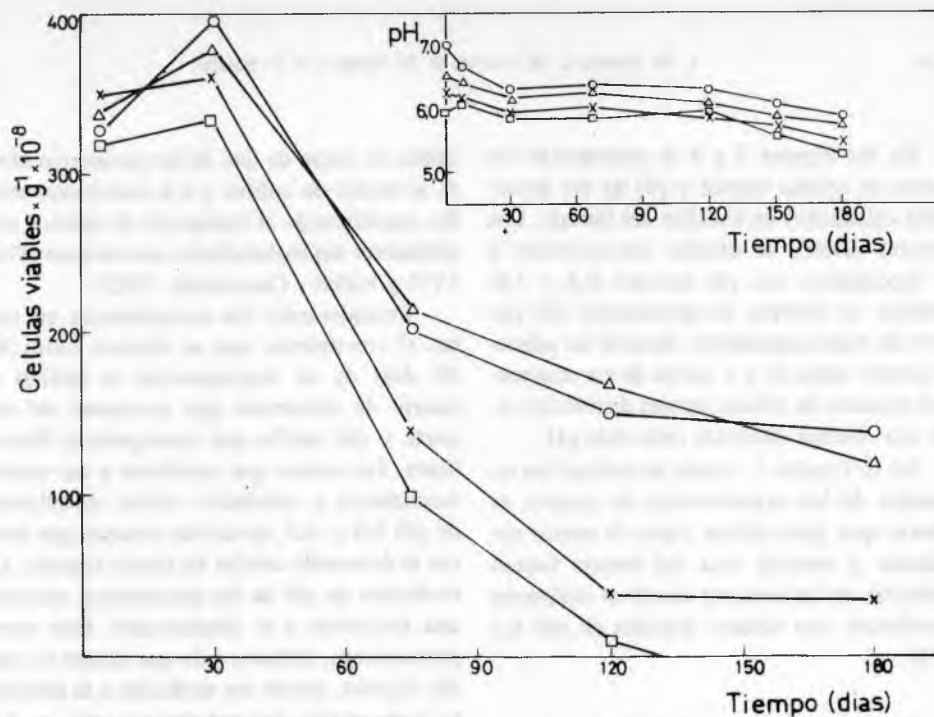


Figura 3: Supervivencia de *Rhizobium meliloti* (cepa B 323) en inoculantes sobre la base de turba. Influencia del pH. pH inicial: □ 6,00; X 6,30; Δ 6,50 y ○ 7,00.

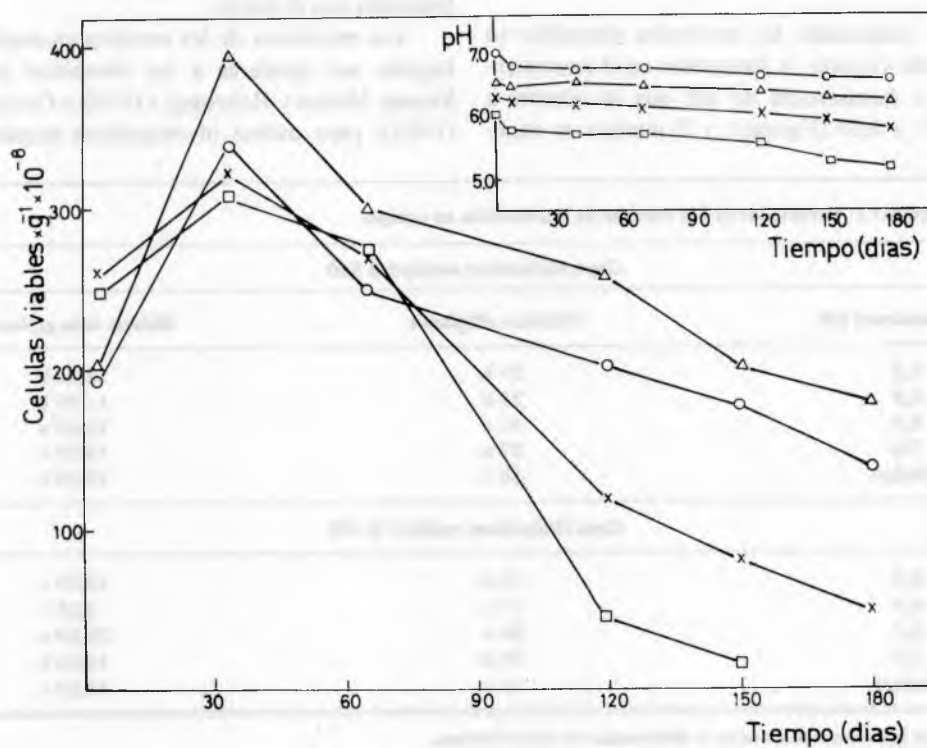


Figura 4: Supervivencia de *Rhizobium meliloti* (cepa B 310) en inoculantes sobre la base de turba. Influencia del pH. pH inicial: □ 6,00; X 6,30; Δ 6,50 y ○ 7,00.

En las Figuras 3 y 4 se representan los valores de células viables y pH de los inoculantes estudiados en función del tiempo. Los mayores niveles de células corresponden a los inoculantes con pH iniciales 6,5 y 7,0. También se observa un incremento del número de microorganismos durante las primeras cuatro semanas y a partir de ese momento el número de células viables disminuye según una cinética diferente para cada pH.

En el Cuadro 1, donde se indican los resultados de los experimentos en campo, se observa que, para ambas cepas, la mayor nodulación y materia seca del forraje fueron obtenidas en los ensayos donde se utilizaron inoculantes con valores iniciales de pH 6,5 y 7,0.

DISCUSION

Analizando los resultados obtenidos en medio líquido, la limitación en el crecimiento y disminución de pH que se observa a 5,75 y 6,00 (Figuras 1 y 2) pueden ser expli-

cados en razón de que dicho parámetro afecta al medio de cultivo y a la membrana celular, modificando el transporte de solutos con alteración del metabolismo microbiano (Pirt, 1975 y Kallas y Castenholz, 1982).

Considerando los experimentos en turba, el crecimiento que se observa hasta los 30 días de su impregnación es debido al aporte de nutrientes que provienen del soporte y del medio que acompaña al *Rhizobium*. Las causas que conducen a un menor crecimiento y viabilidad celular inoculantes de pH 6,0 y 6,3, serían las mismas que limitan el desarrollo celular en medio líquido. La evolución de pH de los inoculantes, muestra una tendencia a su disminución. Este comportamiento, distinto a lo que ocurre en medio líquido, puede ser atribuido a la diferente composición del material soporte, ya que la producción de acidez o alcalinidad no depende únicamente de la cepa sino de su interacción con el medio.

Los resultados de los estudios en medio líquido son similares a los obtenidos por Keyser, Munns y Hoheberg, (1979) y Cooper (1982); pero dichos investigadores emplea-

CUADRO 1: Resultados de los ensayos de inoculación en campo.

Cepa <i>Rhizobium meliloti</i> B 310		
Tratamiento pH	Nódulos n°/planta	Materia seca g/planta
6,0	25 b	12,30 b
6,3	23 b	11,30 b
6,5	41 a	19,40 a
7,0	37 a	15,20 a
Testigo	16 c	10,20 b
Cepa <i>Rhizobium meliloti</i> B 323		
6,0	10 d	10,05 c
6,3	17 c	9,23 c
6,5	30 a	20,50 a
7,0	23 b	14,00 b
Testigo	16 c	10,20 c

Letras iguales corresponden a diferencias no significativas.
 Letras distintas corresponden a diferencias significativas al nivel del 5 %.
 El coeficiente de correlación encontrado entre el número de nódulos y materia seca fue de $r = 0,90$.

ron cultivos con concentración inicial de microorganismos más baja, lo que insume mayores tiempos de proceso.

En cuanto a los experimentos en campo, los cuales deben ser considerados como preliminares, los mejores resultados obtenidos con los inoculantes a pH 6,5 y 7,0 podrían atribuirse a un mayor número de microorganismos incorporados por dichos preparados. Además se podría pensar que la mayor supervivencia a esos valores de pH sería el resultado de el menor estrés a que estarían sometidos los microorganismos presentando los rhizobios un estado fisiológico más favorable para la nodulación.

CONCLUSIONES

Los experimentos en medio líquido y de supervivencia en turba indican que las dos cepas de *Rhizobium meliloti* empleadas (B 310 y B 323) son sensibles a valores de pH inferiores a 6,5.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Balatti, A. P. y Mazza, L. A., 1978. Producción de inoculantes para leguminosas. *Rev. Latinoamer. Microbiol.*, 30: 87-93.
- 2) Cooper, J. E., 1982. Acid Production, Acid Tolerance and Growth rate of *Lotus Rhizobia* in laboratory media. *Soil. Biol. Biochem.*, 14: 127-131.
- 3) Date, R. A. and J. Halliday, 1979. Selecting *Rhizobium* for acid infertile soil of the tropics. *Nature* 277, 62-64.
- 4) Kallas, T. and R. Castenholz, 1982. Rapid Transient Growth at Low pH in the Cyanobacterium *Synechococcus* sp. *J. Bacteriol.* 149: 237-246.
- 5) Keyser, H. H.; D. N. Munns and J. S. Hohenberg, 1979. Acid Tolerance of *Rhizobia* in culture and symbiosis with cowpea. *Soil Sci. Soc. Amer. J.* 43: 719-722.
- 6) Keyser, H. H. and D. N. Munns, 1979. Tolerance of *Rhizobia* to acidity, aluminum and phosphate. *Soil Sci. Soc. Amer. J.* 43: 519-523.
- 7) Pirts, J. S., 1975. Effect of hydrogen ion concentration in Principles of Microbe and Cell Cultivation. ed. Blackwell Scientific Publication. London. Pag. 143-146.
- 8) Vincent, J. M., 1977. *Rhizobium* General Microbiology. In a Treatise on Dinitrogen Fixation Sect. III. ed. Hardy, R. W. F. and Silver, John Wiley and Sons. New York, pág. 277-364.